

NADP 磷酸酶 (NADPase)活性测定试剂盒说明书

(货号: G0895W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

NADP 磷酸酶 (NADPase)主要存在于植物组织中的一种水解酶,与 NADK₁一起调控 NAD⁺和 NADP⁺之间的平衡。该酶能够催化 NADP⁺(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)的水解反应,去除其 2'-磷酸基团,生成 NAD⁺(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)和无机磷酸(Pi)。本试剂盒通过测定无机磷的量来测定 NADPase 活性。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	提取液 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部,再加 0.7mL 蒸馏水,混匀溶解备用。
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 2mL×1 瓶	4℃保存	临用前向每瓶 A 试剂加 1.8mL 的 B 液,再加 23.2mL 的蒸馏水,混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

【注】:全程操作需无磷环境;试剂配置用新枪头和玻璃移液器等,也可用一次性塑料器皿,避免磷污染。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、冰和蒸馏水。

四、NADP 磷酸酶 (NADPase)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织样本:称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例提取

- ② 细胞样本:先收集细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细胞加入 1mL 提取液;超声波破碎细胞(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);4℃约 12,000rpm 离心 10min,取上清作为待测样品。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 700nm。
② 试剂解冻至室温或放在 37℃水浴 5-10 min;在 EP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
试剂一	190	200
样本	100	100
试剂二	10	
混匀, 37℃ 孵育 30min		
试剂三	40	40

混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测。

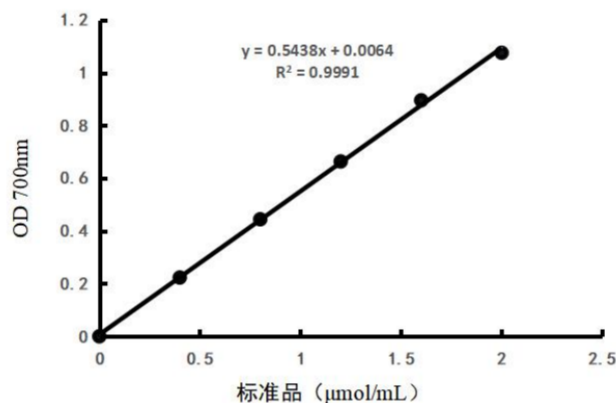
④ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

上清液	50	50
试剂四	200	200
混匀，室温静置 3min（若仍浑浊，可全部取出至离心管中，5000rpm 离心 5min，再等量如 200μL 转移至 96 孔板中），于 700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】若 ΔA 差值小于 0.01，可增加样本取样质量 W（如增至 0.2g），或增加③步中样本加样体积 V1（如由 100μL 增至 200μL，则试剂一相应减少），或延长③步中 37℃ 条件下孵育时间 T（如由 30min 延至 60min），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.5438x + 0.0064$ ，x 是标准品摩尔浓度(μmol/mL)，y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白分解 NADP^+ 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/mg prot)=[$(\Delta A - 0.0064) \div 0.5438 \times V2$] $\div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 12.5 \times (\Delta A - 0.0064) \div \text{Cpr}$

3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解 NADP^+ 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/g 鲜重)=[$(\Delta A - 0.0064) \div 0.5438 \times V2$] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 12.5 \times (\Delta A - 0.0064) \div W$

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞分解 NADP^+ 产生 1nmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力(nmol/h/ 10^4 cell)=[$(\Delta A - 0.0064) \div 0.5438 \times V2$] $\times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 25 \times (\Delta A - 0.0064)$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.1mL； V2---酶促反应总体积，0.34mL；

T---反应时间，1/2 小时； W---样本鲜重，g； 500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液(50μmol/mL)：标准品用 1mL 蒸馏水溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。